

公表特許公報(A)

平5-505179

④公表 平成5年(1993)8月5日

⑤Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

審査請求 未請求

C 07 K 15/06  
3/20

8619-4H  
7731-4H  
8931-4B

予備審査請求 有

部門(区分) 3(2)

C 12 N 15/00

C※

(全 8 頁)

⑥発明の名称 新規フィブロネクチンレセプター

⑩特 願 平3-502972

⑪出 願 平3(1991)1月2日

⑫翻訳文提出日 平4(1992)7月3日

⑬国際出願 PCT/US91/00048

⑭国際公開番号 WO91/09874

⑮国際公開日 平3(1991)7月11日

優先権主張 ⑯1990年1月5日⑰米国(US)⑱461,349

⑲発明者 ルオスラーティ, エルキ ア アメリカ合衆国 カリフォルニア 92067 ランチョ サンタ フ  
イ, エ, ビー, オー, ボックス 1054

⑳出願人 ラ ホヤ キャンサー リサー アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037 ラ ホヤ, ノース ト  
チ ファウンデーション レイ バインズ ロード 10901

㉑代理人 弁理士 山本 秀策

㉒指定国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域  
特許), FR(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), IT(広域特許), JP, KR, LU(広域特許), N  
L(広域特許), NO, SE(広域特許)

最終頁に続く

請求の範囲

方法。

1. サブユニット $\alpha$ , および $\beta_1$ , またはそれらの免疫学的等価物を包含する、実質的に純粋な活性インテグリン。

2. フィブロネクチンおよびGRGDSPKと結合し、ヒドロネクチンとは検出され得るほどには結合しないことによりさらに特徴付けられる、クレーム1に記載の実質的に純粋な活性インテグリンのレセプター。

3.  $\alpha, \beta_1$ インテグリンを単離する方法であって、細胞または組織抽出物を分画する工程、該物質をGRGDSPKを含むカラムに通す工程、および、カラム上に保持された物質を溶出する工程、を包含する方法。

4.  $\alpha, \beta_1$ インテグリンを単離する方法であって、細胞または組織抽出物をフィブロネクチンを含むカラムで分画する工程、および、カラム上に保持された物質を溶出する工程、を包含し、該溶出物が該インテグリンを含んでいる、方法。

5.  $\alpha, \beta_1$ インテグリンの存在を検出する方法であって、該インテグリンを含有する疑いのあるサンプルに $\alpha$ , および $\beta_1$ サブユニットに対する抗体を接触させる工程、および、該サブユニットに対する抗体の結合を検出する工程、を包含する

6.  $\alpha, \beta_1$ インテグリンに対するリガンドの存在を検出する方法であって、該リガンドを含有する疑いのあるサンプルに $\alpha, \beta_1$ インテグリンを接触させる工程、および、インテグリンに対する該リガンドの結合を検出する工程、を包含する方法。

## 明細書

## 新規フィブロネクチンレセプター

## 発明の背景

本発明は接着ペプチドのレセプターに関し、さらに詳細には、フィブロネクチンに親和性を有する新規のレセプターに関する。

多細胞生物、例えばヒトは、およそ $10^{14}$ 個の細胞を有し、この細胞は、例えば血液細胞および神経細胞のような、少なくとも50の異なるタイプに分けられる。細胞は成長ならびに発達の過程で、他の細胞または細胞外の物質に、特異的かつ、規則的な方法で結合する。そのような細胞接着のメカニズムは、細胞の成長、移動および分化のパターンを仲介する際に重要であるようである。細胞接着メカニズムによって、細胞は特殊化した特徴、例えば筋肉細胞または肝細胞として機能するように、発達することができる。細胞接着のメカニズムはまた、脱分化および侵入に、特に、細胞が細胞自身の特殊化した形態を失い、転移ガン細胞になる場合にも、関連する。

細胞同志間の、および細胞と細胞外マトリックスとの相互作用に関するメカニズムは、十分に理解されていない。しかし、細胞表面上のまたは細胞外マトリックス内の同種のリガンドを特異的に認識し、このリガンドに結合する、細胞表面レセプターによって、仲介されると考えられている。

ーを含んでいる。存在する既知の組み合わせの中で、 $\alpha$ サブユニットは $\beta_3$ サブユニットと結合し、ビトロネクチンレセプターを形成し、また最近 $\beta_2$ および $\beta_3$ と呼ばれる2つの $\beta$ サブユニットと結び付くことが報告された。 $\alpha$ 、 $\beta$ 、インテグリンは、ビトロネクチンおよびフィブロネクチンレセプターであるが、 $\alpha$ 、 $\beta$ のリガンド特異性は知られていない。

インテグリンは、正常および異常な細胞プロセスの重要な局面の仲介に重要であるため、異なるインテグリンを同定し、特徴付ける必要がある。本発明は、この必要性を満たし、これに関連する利点を提供するものである。

## 発明の要約

本発明は、 $\alpha$ および $\beta_1$ のサブユニットからなることを特徴とする、実質的に純粋なインテグリン型のレセプターを提供する。この $\alpha$ 、 $\beta_1$ インテグリンは、フィブロネクチンおよびGRGDS PKと結合するが、ビトロネクチンとは結合しない。 $\alpha$ 、 $\beta_1$ インテグリンは、 $\alpha$ 、 $\beta_1$ リガンドの存在を測定するため、および種々のインテグリンに特異的な接着ペプチドを開発するために使用し得る。 $\alpha$ 、 $\beta_1$ の存在により、細胞がフィブロネクチンに接着する能力を評価し得る。

## 図面の簡単な説明

図1は、種々の細胞タイプ上に発現したインテグリンサブユニットを示すゲルの写真である。

細胞外マトリックスに対する細胞の接着およびマトリックス上への細胞の転移は、多くの場合、マトリックスタンパク質中のArg-Gly-Asp含有配列への細胞表面レセプターの結合により仲介される(RuoslahtiおよびPierschbacher, Science 238:491 (1987)に説されている)。Arg-Gly-Asp配列は、少なくともフィブロネクチン、ビトロネクチン、種々のコラーゲン、ラミニンおよびテネイシン中では、細胞接触部位である。細胞接触部位が類似しているにもかかわらず、これらのタンパク質は、特異的なレセプターによって個々に認識され得る。

インテグリンは、Arg-Gly-Asp結合部位を介して細胞外マトリックス膜タンパク質のArg-Gly-Asp結合部位と結合する接着レセプターのファミリーである。これらは、1つの( $\alpha$ )および1つの( $\beta$ )サブユニットからなる、ヘテロダイマー分子である。それぞれの種類にはいくつかのサブユニットが知られており、種々の $\alpha$ 、 $\beta$ の組み合わせは、異なるリガンド特異性を持つレセプターを形成する。

これまでに、11個の区別可能な $\alpha$ 鎖が、報告されている。以前は、これらは、結び付く $\beta$ サブユニットに基づき、3つの主要ファミリーに分けられていた。 $\beta_1$ サブファミリーは、フィブロネクチン、種々のコラーゲン、ラミニンおよびテネイシンのレセプターを含む。 $\beta_2$ のサブファミリーは、白血球特異性レセプターからなり、一方、 $\beta_3$ のサブファミリーは、一般的に、血小板グリコプロテインIIb-IIIaレセプターおよびビトロネクチンレセプターと呼ばれる多重特異的レセプター

図2は、フィブロネクチンおよびビトロネクチンに関する細胞接着アッセイの結果を示す。エラーバーは、3つの独立したアッセイの平均値の標準偏差を示している。

## 発明の詳細な説明

本発明は、 $\alpha$ および $\beta_1$ サブユニットまたはそれらの免疫学的等価物からなる、新しいレセプターに関する。このインテグリン型レセプターを、本明細書では「 $\alpha$ 、 $\beta_1$ レセプター」または「 $\alpha$ 、 $\beta_1$ インテグリン」と呼ぶ。この $\alpha$ 、 $\beta_1$ レセプターは、図1の左のパネルに示したように、 $\alpha$ サブユニットに対するモノクローナル抗体で免疫沈降され、そして $\beta_1$ サブユニットの予期される位置にバンドを含んでいる。

上述の免疫沈降の結果が示す、 $\alpha$ サブユニットと $\beta_1$ サブユニットとの会合を確認するために、各サブユニットに対するモノクローナル抗体を使用して繊維芽細胞株(fibroblast cell line) WI-38からのレセプター複合体を単離した。次に一連の抗体を用いて、同時に単離されたサブユニットを同定した。抗 $\alpha$ モノクローナル抗体により精製された物質を、2つの異なる抗 $\beta_1$ モノクローナル抗体および $\beta_1$ の細胞質領域部位を有するペプチドに対するポリクローナル血清による免疫沈降で精製した。3つの抗 $\beta_1$ 試薬の全てが、 $\alpha$ 含有のインテグリンを認識した。逆に、 $\beta_1$ モノクローナル抗体で得られた物質は、2つの異なる抗 $\alpha$ モノクローナル抗体および $\alpha$ の細胞質領域部位を有するペプチドに対する、ポリクローナル

血清による免疫沈降で精製した。これらの $\alpha$ 、 $\beta$ は、 $\alpha$ 、および $\beta$ サブユニットが、確かに複合体を形成し合合していることを示している。

この新しい $\alpha$ 、 $\beta$ インテグリンのリガンド結合特異性を調べるために、アフィニティクロマトグラフィ実験および細胞接着アッセイを行なった。クロマトグラフィ実験では、 $^{125}$ Iでラベルした1M8 32神経芽細胞(neuroblastoma cells)表面の界面活性剤抽出物を、フィブロネクチンおよびGRGDSPKペプチドアフィニティカラムで分画した。この $\alpha$ 、 $\beta$ インテグリンは、細胞接触部位を含むフィブロネクチンの110Idフラグメントに結合した。これは、細胞接触部位を有するペプチド(GRGDSP)でカラムから抽出したが、関連したペプチドGRGES Pでは溶出しなかった。引き続いてEDTA抽出を行っても、別のバンドは現れなかった。このレセプターはまた、セファロースに結合したペプチドGRGDSPKを含むカラムに結合し、GRGDSPペプチドで溶出したが、GEGESPペプチドでは溶出しなかった。

(以下余白)

抽出された物質が $\alpha$ 、 $\beta$ 複合体であることを確認するために、各カラムからのピークフラクションをブールし、そして、 $\alpha$ 、および $\beta$ サブユニットに対するモノクローナル抗体で免疫沈降した。両方の抗体は、各カラムから同じ2つのバンドを沈降させた。これは、各カラムから特異的に溶出された物質が、実際に $\alpha$ 、 $\beta$ であったことを示している。

細胞接着アッセイでは、1M8 32細胞はフィブロネクチンに結合するが、ビトロネクチン(図2)またはフィブリノーゲン(図示せず)とは結合しないことが示された。フィブロネクチンに対するこれらの細胞接着は、 $\alpha$ 、 $\beta$ 複合体によって仲介されるようである。なぜなら、検出された唯一の他のインテグリンである $\alpha$ 、 $\beta$ は、アフィニティクロマトグラフィ実験で、フィブロネクチンと結合しなかったからである(図1参照)。これらの細胞はまた、おそらく、 $\alpha$ 、 $\beta$ 複合体の存在によって、コラーゲンIおよびIVおよびラミニンに結合した。

このデータは、 $\alpha$ 、 $\beta$ インテグリンサブユニットが会合し、機能的なフィブロネクチンレセプターを形成することを示す。多様性のスプライシングの様な変化による分子の不均一性は、完全には把握されていないが、この新しいレセプターのサブユニットは、各サブユニットに対して少なくとも3つの抗体を用いたが、 $\alpha$ 、および $\beta$ とは、免疫学的に区別できなかった。従って、電気泳動度および免疫学的反応性から判断すると、この新しいレセプターは、 $\alpha$ 、および $\beta$ サブユ

ニット、またはそれらの免疫学的等価物からなっている。

この新しい $\alpha$ 、 $\beta$ は、ビトロネクチンとは結合しないが、GRGDSPKカラムで単離し得る。このリガンド結合パターンは、以前特徴付けられたインテグリンのいずれのとも違うようである。GRGDSPKカラムと結合するこのレセプターの能力は、2つのビトロネクチン結合インテグリン、 $\alpha$ 、 $\beta$  (Pytela,ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5766 (1985)) および血小板レセプター $\alpha$ 、 $\beta$  (Pytela,ら, Science 231:1559 (1986) (およびその中の引例) これらの文献は本明細書では参考として援用される)と共有される特性である。 $\alpha$ 、と最近報告された $\beta$ サブユニットとの複合体もまた、このグループに属し得る(Freed,ら, EMBO 8:2955 (1989)、本明細書では参考として援用される)。また別の最近報告された $\alpha$ 、( $\alpha$ 、 $\beta$ )の複合体は、フィブロネクチンおよびビトロネクチン(Cheresb,ら, Cell 57:59 (1989)、本明細書では参考として援用される)の両方と結合する。

$\beta$ 1クラス( $\alpha$ 、 $\beta$ 1)のフィブロネクチン結合インテグリンは、ビトロネクチンに結合せず、ここに記載した $\alpha$ 、 $\beta$ インテグリンとは異なり検出されるほどにはGRGDSPKカラムと結合しない。そのため、 $\alpha$ 、 $\beta$ 複合体は、ビトロネクチン結合インテグリンおよび $\beta$ 1クラスインテグリンの間の明確な中間特異性を有しているようである。

3つの異なる $\alpha$ サブユニットが、1つ以上の $\beta$ サブユニットと会合することが示された。これらのうちの2つ、 $\alpha$ 、およ

アミノ酸	記号
アラニン	A
アスパラギン酸	D
システイン酸	C
グルタミン	Q
グルタミン酸	E
グリシン	G
ヒスチジン	H
イソロイシン	I
ロイシン	L
リジン	K
メチオニン	M
フェニルアラニン	F
プロリン	P
セリン	S
スレオニン	T
トリプトファン	W
チロシン	Y
バリン	V

び $\alpha_3$ は、2つの $\beta$ サブユニットのいずれともになり得る。 $\alpha$ サブユニットは、既に4つの $\beta$ サブユニットと会合する能力が示されており、特に自由度が高いようだ。さらに、本明細書で述べた $\alpha_1$ と $\beta_1$ の間の会合は、予期し得ないことに、以前に提案された2つのインテグリンのクラスの境界と交わっている。これは現在認められているインテグリン分類の再評価を強いるものである。

コラーゲン、ラミニンおよびフィブロネクチンのレセプターはすべて、共通の $\beta$ サブユニットを共有しているので、 $\alpha$ サブユニットがインテグリンの特異性を決定すると言われている。本明細書に記述した新しい $\alpha_1\beta_1$ インテグリンは、フィブロネクチンレセプターであるが、 $\alpha_1\beta_3$ はヒドロネクチンレセプターである。 $\alpha_1\beta_3$ がフィブロネクチンと結合することが示されたこととこの結果は、 $\beta$ サブユニットが、レセプター特異性を決定するために従来考えられていたよりも大きな役割を担っていることを示している。

$\alpha_1\beta_1$ は、細胞の細胞外マトリックスへの結合する能力のアッセイに有用である。即ち、細胞表面上の $\alpha_1\beta_1$ の存在はフィブロネクチンに結合する能力を示す。 $\alpha_1\beta_1$ インテグリンの存在は、実施例Iに記載したように各サブユニットに対する抗体を使用するイムノアッセイフォーマットで、またはそのイムノアッセイフォーマットの改変によって、検出される。このようなアッセイは、当業者には公知である。一般的には、本明細書では参考として援用する、ANTIBODIES: A LA

BORATORY MANUAL (Barlow and *et al.*, 編) Cold Spring Harbor Laboratory (1988)を参照されたい。

また、 $\alpha_1\beta_1$ レセプターは、インテグリンのリガンドの分析の分野でも有用である。そのようなリガンドの特異性は重要である。例えば、血小板インテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ と結合するがその他のインテグリンとは結合しない、RGD配列を有する合成ペプチドが、抗血小板製剤として開発されている。

$\alpha_1\beta_1$ インテグリンと相互作用する化合物の能力は、実施例IIに記載したように、アフィニティクロマトグラフィーによって評価し得る。試験細胞が有する他のインテグリンの寄与が排除できるならば、細胞接着アッセイは実施例IIIに記載したように使用され得る。最後に、酵素イムノアッセイフォーマットまたは放射線レセプターアッセイを、Hautanenら、J. Biol. Chem. 264:1347-1442 (1989); Gehlsenら、J. Biol. Chem. 264:19034-19038 (1989)に記載のように使用し得る。

以下の実施例は例示を目的としており、本発明の制限を意図するものではない。

#### 実施例I

##### $\alpha_1\beta_1$ インテグリンの同定

インテグリンサブユニットに対する抗体を、以下の表に示すように調製した。

サブユニット	宿主	モノクローナルまたはポリクローナル	免疫原	参考文献または確認法
$\alpha_1$	マウス	モノクローナル Mab 147	精製フィブロネクチンレセプター	イムノプロット法: $\alpha_1$ サブユニットと反応
$\alpha_1$	マウス	Mab 59	精製フィブロネクチンレセプター	イムノプロット法: $\alpha_1$ サブユニットと反応
$\alpha_1$	ウサギ	ポリクローナル	EKRVRPPQEE- QEREQLQPH- ENGEGNSET	Frederick EMBO J. 8:2955 (1989)
$\alpha_1$	ウサギ	ポリクローナル	EKAQLKRP- PATSDA	イムノプロット法: $\alpha_1$ サブユニットと反応
$\alpha_2$	マウス	モノクローナル Co83	$\alpha_2$	Sonnebergら、 J. Biol. Chem. 265:14030 (1990)
$\alpha_2$	マウス	モノクローナル P185	$\alpha_2$	Vagner and Carter J. Cell Biol. 103:1073 (1987)
$\alpha_3$	ウサギ	ポリクローナル	$\alpha_3$ サブユニットの細胞質ドメイン	Sykesら、 J. Cell Biol. 103:409 (1989)
$\beta_1$	ウサギ	ポリクローナル	KKKEKEKMN- AKWDTGENP- IYSAVTTTV- NPKYEGK	イムノプロット法: $\beta_1$ サブユニットと反応
$\beta_1$	マウス	モノクローナル LM 534 LM 442	精製フィブロネクチンレセプター	イムノプロット法: $\beta_1$ サブユニットと反応

(以下 余白)

ヒトの神経芽細胞 (Human neuroblastoma cells) (IMR 32; ATCC 受託番号 CCL 127)、肺細胞癌細胞 (lung cell fibroblasts) (WI-38; ATCC 受託番号 CCL 75)、例えば、(WI-38; ATCC 受託番号 CCL 757) およびグリア細胞腫細胞 (glioblastoma cells) (U251) は、本明細書では参考として援用する Pytelら、Cell 40:191-198 (1985) による  $^{125}$ I およびラクトペルオキシダーゼで表面をラベルし、これを0.5%トリトン-X-100、150mM NaCl、1  $\mu$ g/mlロイペプチン、1 mg/mlアプロタニン、0.4  $\mu$ g/mlペプスタチンおよび10 mM トリス、pH7.2を含む緩衝液で抽出した。インテグリンヘテロダイマーを、この $\beta_1$ または $\alpha$ サブユニットのいずれかに特異的な抗体で免疫沈降させ、SDS-PAGEによって分析した。簡単に述べると、この抽出物を、15,000rpmで遠心分離し、免疫前のラビットまたはマウスIgG-セファロースとともにインキュベートしてあらかじめ沈降させた。1次抗体とのインキュベーション後、免疫複合体を、セファロースプロテインAまたはセファロース-ヤギ抗マウスIgGのいずれかで明らかにした。

$\alpha_1$ 含有インテグリンおよび $\beta_1$ 含有インテグリンを、それぞれ抗 $\alpha_1$  (Mab 147) および抗 $\beta_1$  (Mab LM 534) セファロースカラムで、WI-38抽出物から免疫精製した。このカラムを、0.5%トリトン-X-100含有の50mM グリシン-HCl pH3で抽出した。中和の後、この物質を、抗 $\beta_1$ 抗体または抗 $\alpha_1$ 抗体を用いる免疫沈降用に3つに分け、この免疫沈降物を、SD

S-PAGEによって、実質的に上述のように分析した。それぞれの場合、 $\alpha$ 、および $\beta_1$ サブユニットの間の会合が見られた。

## 実施例II

### $\alpha$ 、 $\beta_1$ インテグリンの リガンド特異性の分析および精製

IMR 32細胞を、表面を $^{125}\text{I}$ でラベルし、200mM オクテルグルコシド、150mM NaCl、1 mM  $\text{CaCl}_2$ 、1 mM  $\text{MgCl}_2$ 、1 mM  $\text{MnCl}_2$ 、1  $\mu\text{g/ml}$ ロイペプチン、1  $\mu\text{g/ml}$ アプロタニン、0.4  $\mu\text{g/ml}$ ペプスタチンおよび10mM トリス、pH7.2中で溶解した。この細胞抽出物を、110 kDフィブロネクチンフラグメントーセファロースカラムにかけ、このカラムを50mMオクテルグルコシド、1 mM  $\text{CaCl}_2$ 、1 mM  $\text{MgCl}_2$ 、1 mM  $\text{MnCl}_2$ 、150mM NaCl、および10mM トリス、pH7.2、単独で、および1 mg/ml GRGESPペプチドと共に洗浄した。このカラムを1 mg/ml GRGDSPPペプチドで抽出し、その後、10mM EDTAで抽出した。IMR 32細胞抽出物もまた、同じ方法でGRGDSPPKカラムで分画した。

これらの工程は、本明細書では参考として援用するPytelaら、Meth. Enzymol. 144:475-489 (1987); およびGallitおよびRuoslahti, J. Biol. Chem. 263:12927-12932 (1988)に記載されている工程と類似している。各カラムからの抽出物は、

1つの $\alpha$ および1つの $\beta$ ユニットを有するインテグリンを含んでいた。そのピークの画分をプールし、実施例Iに記載されている抗 $\beta_1$  (Mab LM 534) または抗 $\alpha_v$  (Mab 147) で、免疫沈降させた。このカラムに結合したインテグリンは、抗 $\alpha_v$ および抗 $\beta_1$ の両方で沈降することがわかった。これは、 $\alpha_v$ および $\beta_1$ サブユニットの会合を示している。

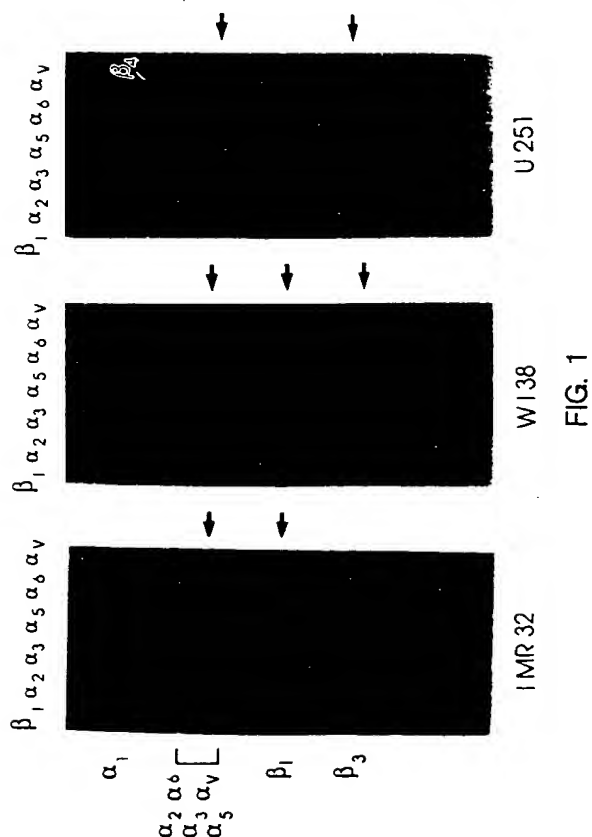
## 実施例III

### 細胞粘着アッセイ

マイクロタイタプレートに、種々の濃度のフィブロネクチンおよびビトロネクチンでコートし、0.05%ウシ血清アルブミンでさらにコートした。洗浄した後、IMR 32 (ヒト神経芽細胞; ATCC CCL 127) またはMG-63 (ヒト骨肉腫; ATCC CCL 1427) 細胞をウェル当たり約 $10^5$ プレートし、90分間37℃でインキュベートした。この接着した細胞を、3%パラホルムアルデヒドで固定し、0.5%クリスタルバイオレッドで染色した。この接着物を、800nmの吸光度を読むことにより、定量した。図2に示すように、IMR 32細胞は、フィブロネクチンに接着し、ビトロネクチンまたはフィブリノーゲンには接着しなかったが、MG-63細胞は、3つのすべての基質に結合した。

本発明は好ましい実施態様を用いて記述されたが、種々の変更が、本発明の意図を変えることなくなされ得ることが理

解されるべきである。従って、本発明は、以下の特許請求の範囲によってのみ限定される。



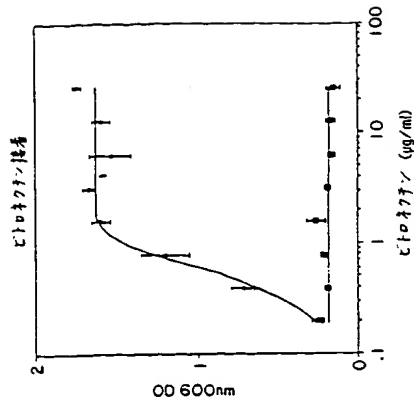


FIG. 2B

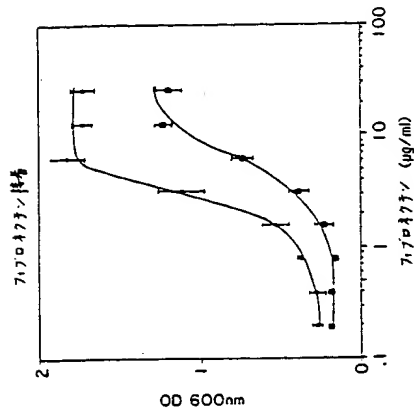


FIG. 2A

本発明は、 $\alpha_5$ および $\beta_1$ サブユニットからなることを特徴とする実質的に純粋な活性インテグリンを提供する。そのレセプターは、フィブロネクチンおよびGRGDSPKと結合し、ビトロネクチンとは結合しない。 $\alpha_5\beta_1$ レセプターは、フィブロネクチンの存在を測定するために使用し得る。

補正書の写し(翻訳文)提出書(特許法第184条の8)

平成4年7月3日

特許庁長官殿

1. 特許出願の表示

PCT/US91/00048

2. 発明の名称

新規フィブロネクチンレセプター

3. 特許出願人

住所 アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037

ラ ホヤ, ノース トレイ パインズ ロード  
10901

名称 ラ ホヤ キャンサー リサーチ  
ファウンデーション

4. 代理人

住所 〒540 大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号

クリスタルタワー13階

氏名 (7828) 井理士 山本秀策

電話(大阪) 06-349-3910

5. 補正書の提出年月日

1991年12月13日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の写し(翻訳文)



1 通

請求の範囲

1. サブユニット $\alpha_5$ および $\beta_1$ 、またはそれらの免疫学的等価物を包含する、実質的に純粋な活性インテグリン。

2. フィブロネクチンおよびGRGDSPKと結合し、ビトロネクチンとは検出され得るほどには結合しないことによりさらに特徴付けられる、クレーム1に記載の実質的に純粋な活性インテグリンのレセプター。

3.  $\alpha_5\beta_1$ インテグリンを単離する方法であって、細胞または組織抽出物を分画する工程、該物質をGRGDSPKを含むカラムに通す工程、カラム上に保持された物質を溶出する工程、および、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンを該溶出した物質から分離する工程、を包含する方法。

4.  $\alpha_5\beta_1$ インテグリンを単離する方法であって、細胞または組織抽出物をフィブロネクチンを含むカラムで分画する工程、カラム上に保持された物質を溶出し、該溶出物が該インテグリンを含んでいる工程、および、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンを該溶出した物質から分離する工程、を包含する方法。

5.  $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの存在を検出する方法であって、該インテグリンを含有する疑いのあるサンプルに $\alpha_5$ および $\beta_1$

サブユニットに対する抗体を接触させる工程および、該サブユニットに対する抗体の結合を検出する工程、を包含する方法。

6.  $\alpha$ ,  $\beta$ , インテグリンに対するリガンドの存在を検出する方法であって、該リガンドを含有する疑いのあるサンプルに  $\alpha$ ,  $\beta$ , インテグリンを接触させる工程、および、インテグリンに対する該リガンドの結合を検出する工程、を包含する方法。

International Application No. PCT/US 91/00048	
1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classifications apply, indicate all)	
According to International Patent Classification (IPC) or to both Regional Classification and IPC	
IPC5: C 07 K 15/06	
2. FIELDS SEARCHED	
Minimum Documentation Searched	
Classification System	Classification Symbols
IPC5	C 07 K
Do not document Searchable other than minimum Documentation to the extent that such documents are included in Fields Searched	
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant date(s)
P, X	Dialog Information Services, File 154: Medline 85-91, Dialog accession no. 07295850, Bodary SC et al: "The integrin beta 1 subunit" associates with the vitronectin receptor alpha v subunit" to form a novel vitronectin receptor in a human embryonic kidney cell line", & J Biol Chem Apr 15 1990, 265 (11) p5938-41
	1,3-6
P, X	Dialog Information Services, File 55: Biosis 85-91, Dialog accession no. 7670156, Dedhar S et al: "Isolation of a novel integrin receptor mediating arg-gly-asp-directed cell adhesion to fibronectin and type I collagen from human neuroblastoma cells association of a novel beta-1-related subunit with alpha-v", & J Cell Biol 110 (6). 1990. 2185-2194
	1,3-6
<p>* Special categories of cited documents</p> <p>* "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular importance</p> <p>* "E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>* "L" document which may have priority over the present application or which is cited to establish the publication date of another document or other special reason (see comments)</p> <p>* "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>* "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date</p> <p>* "T" later document published after the international filing date or priority date and in contact with the application but not to be considered in the prior art of the present application</p> <p>* "X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>* "Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step unless the document is combined with one or more other such documents, each contribution being deemed to be a part of the art</p> <p>* "Z" document number of the same patent family</p>	
IV. CERTIFICATION	
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of the International Search Report
22nd April 1991	15 MAY 1991
International Searching Authority	Signature of Authorizing Officer
EUROPEAN PATENT OFFICE	CHRISTY TAZELAAR

International Application No. PCT/US 91/00048	
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)	
Category	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant date(s)
P, A	Dialog Information Services, File 154: Medline 85-91, Dialog accession no. 07516653, Joseph LB et al: "Characterization of Chinese hamster ovary cells with impaired spreading properties on fibronectin", & J Cell Sci (ENGLAND) Jul 1990, 96 (Pt 3) p519-26
	1-6
A	Science, vol. 238, October 1987, Erkki Ruoslahti et al.: "New Perspectives in Cell Adhesion: RGD and Integrins", see page 491 - page 497 the whole article
	1-6
A	Nature, vol. 309, May 1984, Michael D. Pierschbacher et al.: "Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule", see page 30 - page 33 the whole article
	1-6

## 第1頁の続き

⑤Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号
C 12 P 21/00	A	8214-4B
G 01 N 33/53	V	8310-2J
// C 12 N 15/06		
C 12 P 21/08		8214-4B
(C 12 P 21/00		
C 12 R 1:91)		
(C 12 P 21/08		
C 12 R 1:91)		

⑫発明者	タロネ, グイド	イタリア国 トリノ 10100 ストラータ デル カンテロー 9 / 2
⑬発明者	ジャンコッティ, フィリポ ジ ー.	アメリカ合衆国 カリフォルニア 92014 デル マール, フォー ス ストリート 201
⑭発明者	ボーゲル, ブルース イー.	アメリカ合衆国 カリフォルニア 92122 サン ディエゴ, アバ ートメント 72 デコロ ストリート 4178